

論文の内容の要旨

論文題目 ステロイドホルモンが海馬神経細胞に与える急性作用の
解析

氏名 高橋泰城

脳神経系におけるシナプス伝達の効率変化は次のような過程を経ておこる。通常、前シナプス神経細胞から放出されたグルタミン酸を受けて、まず AMPA 型グルタミン酸受容体が開口し、後シナプス神経細胞が脱分極し、NMDA 型グルタミン酸受容体が開口して神経細胞内にカルシウムイオンが流入する。この過程が特定のシナプスにおいて繰り返されると、流入したカルシウムイオンによって細胞内タンパクのリン酸化などが起こり、長期増強と呼ばれるシナプス伝達効率の上昇がおこる。特に海馬 CA1-CA3 間の長期増強では NMDA 受容体の役割が非常に重要である。

通常ステロイドホルモンは副腎皮質細胞において、コレステロールから合成される。特にストレスステロイドホルモンは生体へのストレスに反応して分泌される。一方、硫酸プレグネノロンなどの神経ステロイドは脳内で合成されていることが明らかにされつつある。最近、ラットやマウスなど様々なモデル動物を用いた研究で、ステロイドホルモンが記憶・学習能に大きな影響を与えることが知られてきた。特に、ストレスに反応して分泌されるストレスステロイドが動物の記憶・学習能を低下させることが発見されているが、その神経機構は明らかになっていなかった。

本研究ではステロイドホルモンが記憶学習能に与える影響の神経機構を研究するため、

カルシウムが流入するので細胞膜電位が上昇する。その結果、電位感受性カルシウムチャンネルが開閉し、開閉した電位感受性カルシウムチャンネルを介して流入するカルシウムイオンもある程度存在する。そのような電位感受性カルシウムチャンネル経由のカルシウム流入がどの程度、本研究で測定しているカルシウム信号に寄与しているのかを調べるため、代表的な電位依存性カルシウムチャンネルである L-type の電位依存性カルシウムチャンネルを阻害した条件で、コルチコステロンの効果を解析した。

10 μ M のニカルジピン (L-type の電位依存性カルシウムチャンネルの阻害剤) で 20 分間前処理した (コルチコステロン存在条件の実験では同時に 10 μ M のコルチコステロンで前処理) 後、NMDA に対する海馬神経細胞の Ca^{2+} 反応を測定した。その結果、細胞内カルシウム濃度上昇は、ニカルジピンによって多少低下したものの、統計的に有意な差ではなかった。また、延長型の Ca^{2+} 信号を発生した海馬神経細胞は、コルチコステロンが存在する場合には、たとえ電位依存性カルシウムチャンネルが阻害されていても 89.1% 存在し、コルチコステロンの Ca^{2+} 信号延長効果は消失しなかった。次に、海馬神経細胞を、10 μ M のコルチコステロンと同時に 10 μ M のシクロヘキシミド (タンパク合成の阻害剤) で 20 分間インキュベートし、それから 100 μ M の NMDA を投与した。その結果、85.1% の海馬神経細胞で、延長型の Ca^{2+} 信号が観察された。古典的ステロイド作用は新規タンパク合成を経て効果を発揮すると考えられており、この実験結果は、その新規タンパク合成が起きなくてもコルチコステロンが Ca^{2+} 信号を延長させるということを示しているので、コルチコステロンが NMDA 受容体経由のカルシウム信号に与える効果が古典的ステロイド作用によるものではないことを示している。

神経細胞に 0.2 μ M の rhodamine 123 を負荷してから 100 μ M の NMDA を単独で神経細胞に作用させたとき、rhodamine 123 の蛍光を経時的に測定すると一時的な蛍光強度の低下が観察された。rhodamine 123 を負荷した神経細胞を、20 分間コルチコステロンでインキュベーションしてから NMDA を投与すると、rhodamine 123 の蛍光は低下し、そのままミトコンドリアはもとの膜電位差を回復しない状態が継続した。このように、コルチコステロン存在下と非存在下におけるミトコンドリア膜電位の時間変化のパターンの違いは、 Ca^{2+} 信号の場合と一致していた。さらにミトコンドリアの脱共役剤である FCCP (carbonyl cyanide p-trifluoro-methoxyphenyl hydrazone) を神経細胞に投与したとき rhodamine 123 の蛍光強度が次第に低下していくのが観察された。これにより、rhodamine 123 の蛍光を測定することによってミトコンドリアの膜電位の測定が行われていることが確かめられた。

これらの結果から、コルチコステロンの存在下では、NMDA 受容体経由のカルシウム流入が延長され、海馬神経細胞のミトコンドリア膜電位差を持続的に低下させることによ

記憶・学習の神経素過程であるシナプス可塑性が NMDA 受容体経由のカルシウム信号によって引き起こされることに着目し、そのカルシウム信号が、ストレスステロイドや神経ステロイドによってどのように制御されているかを、神経細胞内カルシウムやミトコンドリアの膜電位の蛍光顕微イメージングによって解析した。

試料としては、誕生後 3-5 日目のウィスターラットより調製した海馬神経細胞を用いた。培養開始後 7-10 日経過後に蛍光測定をおこなった。

海馬神経細胞内カルシウムの蛍光顕微イメージングのプロープとして、カルシウム感受性蛍光色素 *fura-2* を使用し、 $5\mu\text{M}$ の濃度で 30 分間海馬神経細胞内に負荷した。ミトコンドリアの膜電位の蛍光顕微イメージングのためには *rhodamine123* を海馬神経細胞に $0.2\mu\text{M}$ で負荷して蛍光測定を行った。

海馬神経細胞に $100\mu\text{M}$ の NMDA を投与したところ一時的な細胞内カルシウム濃度上昇が 94.6% の海馬神経細胞において発生し、一分程度で上昇した細胞内カルシウム濃度は NMDA 刺激前の状態に戻った。一方、 $1\mu\text{M}$ 以上のコルチコステロンで海馬神経細胞をインキュベートした後、 $100\mu\text{M}$ の NMDA を投与すると、単独で NMDA を投与した場合とは全く異なり、非常に延長された神経細胞内カルシウム濃度上昇が 88.1% の海馬神経細胞において観察された。このように、コルチコステロンによってカルシウム信号が延長された海馬神経細胞の割合は、プレインキュベーションに用いたコルチコステロンの濃度を $1\mu\text{M}$ から $5\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$ 、 $50\mu\text{M}$ と上昇させていったところ、88.1%、91.2%、92.4%、95.5% と増加した。

海馬神経細胞を $10\mu\text{M}$ のコルチコステロンでインキュベートした後、 $100\mu\text{M}$ の NMDA を投与し、延長型の Ca^{2+} 信号が発生している状態で、NMDA 受容体の特異的チャネル阻害剤である MK-801 ($10\mu\text{M}$) を投与するという実験を行った。すると、MK-801 の投与直後に、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ はすみやかに初期値にまで完全に低下し、 Ca^{2+} 信号は消失した。このことから、コルチコステロンによるこの延長効果は NMDA 受容体経由のカルシウムに対してはたらいっているということが分かる。また、海馬神経細胞のカルシウムのくみ出しを阻害しているわけではないことが分かる。さらに、コルチコステロンの存在下によって、NMDA によって誘起されるカルシウム信号が延長型になっている状態でコルチコステロンを洗い流して取り除いてやると、延長型のカルシウム信号が消失し、その後 NMDA を加えると再び一時的なカルシウム信号が発生した。この実験結果からコルチコステロンの作用は、不可逆的なものではないことが示唆された。次に、細胞内カルシウムストアの寄与を調べるためにタプシガルジンによって細胞内カルシウムストアを枯渇させた条件下で、コルチコステロン存在下と非存在下で NMDA を加えて、カルシウム信号を計測した。その結果、今回見出した、コルチコステロンによって延長されたカルシウム信号には、細胞内カルシウムストアの寄与はほとんどないことが分かった。

海馬神経細胞内にカルシウムを流入させる経路は NMDA 受容体だけではなく、電位感受性カルシウムチャネルも存在し、神経細胞の脱分極（細胞膜電位の上昇）に応じてカルシウムを細胞内に流入させる。NMDA の投与により海馬神経細胞の NMDA 受容体が開口し、

て海馬の神経機能低下がおこることが示唆される。海馬神経細胞に対してコルチコステロンのアゴニストであるデキサメサゾン ($1\mu\text{M}$) やコルチゾール ($10\mu\text{M}$) 存在下でNMDAを投与したところ、どちらの場合もほとんどの海馬神経細胞において、非常に延長されたカルシウム信号が観察された。NMDAに反応した海馬神経細胞のうち、延長型のカルシウム信号を発生した細胞の割合は、デキサメサゾンによる前処理では94.2%であり、コルチゾールの場合では88.4%であった。即ち、ステロイドによる制御によってカルシウム信号が延長型になってしまった海馬神経細胞の割合は、 $10\mu\text{M}$ コルチコステロン、 $1\mu\text{M}$ デキサメサゾン、 $10\mu\text{M}$ コルチゾールの三者ではあまり違いが見られなかった。

ステロイドによるNMDA受容体制御の阻害剤としても知られているプロゲステロンを $10\mu\text{M}$ の濃度でコルチコステロンとともに海馬神経細胞に対して前処理してやると、コルチコステロンによるカルシウム信号への作用はやはり阻害された。しかし、プロゲステロンそれ自体はNMDA投与によるカルシウム信号には影響しなかった。ラットの空間学習能を向上させる硫酸プレグネノロンで海馬神経細胞を10-20分間インキュベートした後、NMDAを投与したところ、一時的な、有意に大きなカルシウム信号が大部分の海馬神経細胞において観察された。この条件下では、細胞内カルシウム上昇はNMDA単独で発生したカルシウム信号の場合の1.4倍であった。

これらの実験結果より、ストレスステロイドは古典的ステロイド効果とは異なる経路で急性的にカルシウム信号を延長させ、神経細胞のミトコンドリア膜電位を持続的に低下させ、機能低下させるのに対して、神経ステロイドである硫酸プレグネノロンはカルシウム信号を瞬間的に増大させ、長期増強を促進するということが示唆される。